

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許出願公告番号

特公平7-63383

(24) (44)公告日 平成7年(1995)7月12日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 13/14	A	2121-4B		
// C 1 2 N 1/20	A	8828-4B		
(C 1 2 P 13/14				
C 1 2 R 1:15)				

発明の数1(全 6 頁)

(21)出願番号 特願昭62-75727  
(22)出願日 昭和62年(1987)3月27日  
(65)公開番号 特開昭63-240779  
(43)公開日 昭和63年(1988)10月6日

微生物の受託番号 FERM BP-1539  
微生物の受託番号 FERM BP-1540  
微生物の受託番号 FERM BP-1541  
微生物の受託番号 FERM BP-1542

(71)出願人 999999999  
味の素株式会社  
東京都中央区京橋1丁目15番1号  
(72)発明者 山田 和彦  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内  
(72)発明者 瀬戸 光  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内

審査官 佐伯 裕子

(54)【発明の名称】 新規な微生物およびそれを用いるグルタミン酸の製造法

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】最高生育温度が43℃以上、温度抵抗性が55℃-10分以上かつ著量のグルタミン酸を蓄積する能力を有する新規な微生物、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスを用いてグルタミン酸発酵を行ない培養液中よりグルタミン酸を採取することを特徴とするグルタミン酸の製造法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は発酵法によるグルタミン酸を著量に蓄積する新規な微生物、およびその微生物を培養して目的物を製造する方法に関する。

【従来の技術】

微生物を用いてグルタミン酸を著量蓄積せしめ、これを採取する方法、すなわちグルタミン酸発酵の工業生産で

2

は、グルタミン酸を培地中に著量に蓄積する能力を有する微生物、いわゆるグルタミン酸生産菌を発酵タンク中で適当な培地を用いpH、温度、溶存酸素量などの培養条件を適正な条件下にコントロールして行われている。従来知られているグルタミン酸生産菌の分類については数多くの報告があり、例えば以下のものを挙げることが出来る。

1. 木下らAminoAcids 2 42 (1960), (以下文献①)
2. 奥村ら農化誌36 141 (1962), (以下文献②)
3. 高山ら農化誌39 328 (1965), (以下文献③)
4. 高山ら農化誌39 335 (1965), (以下文献④)
5. 高山ら農化誌39 342 (1965), (以下文献⑤)
6. 駒形らJ. Gen. Appl. Microbiol., 15 243 (1969), (以下文献⑥)
7. 山田らJ. Gen. Appl. Microbiol., 16 103 (1970), (以下文献⑦)

下文献⑦)

8. 山田らJ. Gen. Appl. Microbiol., 16 215 (1970), (以下文献⑧)

9. 山田らJ. Gen. Appl. Microbiol., 18 399 (1972), (以下文献⑨)

10. 山田らJ. Gen. Appl. Microbiol., 18 417 (1972), (以下文献⑩)

これらの報告でグルタミン酸生産菌とはグルタミン酸を培地中に著量に蓄積する菌であるが厳密な定義がなされている訳ではない。しかしその量的目安としては、文献⑩に述べられているように培地中に30g/ℓ以上、かつ対グルコース収率が30%以上のグルタミン酸を蓄積する工業的に利用可能な微生物をさすものと解釈出来る。

これらの既知のグルタミン酸生産菌はすべて好気性、グラム陽性、孢子を形成しない桿菌でありコリネフォルム細菌とよばれている菌群に含まれるが、さらにグルタミン酸を培地中に著量に蓄積する能力を有する、ピオチン要求性である、細胞壁中にメソジアミノピメリン酸を含有する、DNAのGC含量が55%付近にある、形態的特徴および生理・生化学的性状が相互に類似しているなどの事実が知られており、これらのことからグルタミン酸生産菌と呼ばれている既知の微生物は分類学的には相互に近縁のものであることは広く認められているところである。

このように相互に近縁な微生物であると考えられているにも拘らず、既知のグルタミン酸生産菌はプレビバクテリウム属 (Brevibacterium属)、コリネバクテリウム属 (Corynebacterium属) 或はマイクロバクテリウム属 (Microbacterium属) など異なった属に同定されている。これは同定を行った時代の違い、なかんづく世界でもっとも権威ある細菌の同定書であるバーチスマニュアルデタミネイティブバクテリオロジーの同定時に於ける最新版の分類体系や分類基準の考え方の相違や、同定者の分類基準のウェイトの置き方の相違などがこのような現象をもたらした要因と考えられる。また木下ら (文献⑪) は約20株のグルタミン酸生産菌について分類学的な研究を行ないこれらの菌のもつ共通の性質を分類基準としてグルタミン酸生産菌属の設定を主張しているが、現在までこの主張は広く採用されるには至っていない。

一方、グルタミン酸発酵の工業凄惨では上述したグルタミン酸生産菌をブドー糖、蔗糖や酢酸などの成分を含む培地で窒素源としてアンモニア、尿素或は硫安などを用いて好気条件下で培養し培地中にグルタミン酸を著量蓄積せしめる。グルタミン酸の蓄積量は培地の組成、培養pH、培養温度溶存酸素量および菌体内に生成したグルタミン酸を培地中に排出せしめる手段などにより異なってくるが、これらの因子を至適に設定することにより容易に対ブドー糖収率30%以上かつ溶培養中のグルタミン酸の蓄積濃度30g/ℓ以上でグルタミン酸を蓄積させることが可能である。

[発明が解決しようとする問題点]

グルタミン酸は上述せる発酵法により我が国はもとより世界の多くの国々で工業生産されている。工業生産を実施するに当り最も重要な因子の一つに経済性がある。本発明は発酵法によるグルタミン酸の工業生産の経済性を高める技術を提供するものである。

[問題点を解決するための手段]

グルタミン酸発酵の工業生産において経済性を高める技術的な要因はいくつかある。例えば対糖収率の向上、グルタミン酸の蓄積濃度の向上、培養時間の短縮化等々である。其の他に要因として重要なものに培養温度の高温化がある。培養温度はグルタミン酸発酵至適温度で行れるが従来のグルタミン酸生産菌を使用する場合、この温度は通常31~32°である。培養が開始されると発酵熱が発生するためにそのまま放置すれば培養液の温度は上昇しグルタミン酸の生成は著じるしく低下する。培養液の温度を至適に維持するためには、発酵槽内に熱交換機を設置し、これに冷水を循環させることが必要となる。冷水を得るためには冷凍機を使用しなければならないが発生する発酵熱が莫大であるため冷凍機で消費する電気エネルギーも大きなものとなっている。従ってグルタミン酸発酵の培養温度を従来より上昇させることが出来れば冷却負担が減少し、もって本工業生産の経済性を高めるものである。

本発明者らは叙上の問題点を解決するため種々の研究を行った結果、従来のグルタミン酸生産菌では生育し得ない45°で生育出来る微生物の中に、従来のグルタミン酸生産菌と同等のグルタミン酸生産能 (対糖収率30%以上、グルタミン酸蓄積量30g/ℓ以上) を有し、かつ従来のグルタミン酸生産菌では生育せずグルタミン酸発酵の実施不能な高温領域 (例えば43°) で著量のグルタミン酸を蓄積する能力を有する新規な微生物を見出し、その微生物を用いてグルタミン酸発酵を行ない培地中に著量のグルタミン酸を蓄積せしめる条件を見出すことにより本発明を完成するに至った。

以下に本発明の詳細について述べる。

従来のグルタミン酸生産菌の生育温度に関しては、上述の引用した報告の中で触れられている限り、いずれの報告でもグルタミン酸生産菌の共通の性質であるとして、文献①では28°-37°で良好な生育をする。文献②では30°-37°で良好な生育を示し42°では極めて悪く生育しないものが多い、文献④では至適生育温度25°-37°、42°では微かな生育、文献⑤では42°で生育するものはない、と報告されている。それぞれの報告では実施方法の違い、生育の判定基準の違いがあるとしても、従来のグルタミン酸生産菌の最高生育温度はせいぜい42°程度であると、類推される。そこで発明者らは、従来のグルタミン酸生産菌として取扱われている菌株中より入手し得るものの殆どを網羅した表-1に示した20株を用い、ニュートリエントブロス培地として振盪式液体恒温槽による方法、及びニュートリエントアガー培地と

した平板培養を高精度気体恒温槽による方法の2法を用いて最高生育温度を検定した。その結果供試菌株はすべて42°では液体培養及び平板培養の何れでも、生育は認められなかった。すなわち従来のグルタミン酸生産菌の最高生育温度は42°以下と判定した。

〔表1〕 最高生育温度および温度抵抗性を検定した既知グルタミン酸生産菌

<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	ATCC 13745
<i>Brevibacterium divaricatum</i>	NRRL B2312
<i>Brevibacterium flavum</i>	ATCC 13826
<i>Brevibacterium flavum</i>	ATCC 14067
<i>Brevibacterium glutamigenes</i>	ATCC 13747
<i>Brevibacterium immariophilum</i>	ATCC 14068
<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	ATCC 13869
<i>Brevibacterium roseum</i>	ATCC 13825
<i>Brevibacterium saccharolyticum</i>	ATCC 14066
<i>Brevibacterium taipei</i>	ATCC 13744
<i>Brevibacterium thiogenitalis</i>	ATCC 19240
<i>Corynebacterium acetoacidophilum</i>	ATCC 13870
<i>Corynebacterium callunae</i>	NRRL B2244
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13032
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13761
<i>Corynebacterium herculis</i>	ATCC 13868
<i>Corynebacterium lilium</i>	NRRL B2243
<i>Corynebacterium melassecola</i>	ATCC 17965
<i>Corynebacterium sp.</i>	ATCC 14747
<i>Microbacterium ammoniaphilum</i>	ATCC 15354

\* 本発明者らは従来の培養温度よりも高温領域でグルタミン酸発酵を行うためには少くとも従来のグルタミン酸生産菌より最高生育温度が高い微生物であることが要件となるであろうとの仮説のもとに自然界の各種のサンプルを微生物分離源として43℃で生育する微生物を分離し、その中から著量のグルタミン酸を培地中に蓄積する能力のある菌株を探索し、異なった微生物分離源より14株を取得した。これらの菌株の菌学的性質を検定し同定を行った結果、分離株は相互に類似しており同一種に含まれるものと判定した。以下に代表的な4株(菌株番号、AJ12308, AJ12309, AJ12310, AJ12340)について菌学的性質を記載する。

10

	AJ12308	AJ12309	AJ12310	AJ12340
形態				
(1)細胞の形, 大きさ	0.7~1.0×1.0~4.0ミクロンの桿菌, 細胞の両端は丸味を有する。スナッピング分裂にもとずくV形配列がみられる。	同左	同左	同左
(2)多形性の有無	多形性は認められないが培養の時期によっては稀れに長大桿状細胞, 肥大細胞, 幼稚な分岐細胞が存在する。	同左	同左	同左
(3)運動性の有無	無し	同左	同左	同左
(4)胞子の有無	無し	同左	同左	同左
(5)グラム染色性	陽性	同左	同左	同左
(6)抗酸性	陰性	同左	同左	同左
生理的性質				
(1)肉汁寒天平板培養	豊富ないし中等度の生育、コロニーは円形, 平滑, 全円丘状, 光沢あり, 不透明ないし半透明, 鈍い黄色, バター様。	同左	同左	豊富ないし中等度の生育、コロニーは円形, 平滑, 光沢あり, 不透明ないし半透明, 鈍い黄色や、フレーク状を呈す

	AJ12308	AJ12309	AJ12310	AJ12340
(2)肉汁寒天斜面培養	豊富ないし中等度の生育、糸状、光沢あり、鈍い黄色	同左	同左	同左
(3)肉汁液体培養	中等度の生育、ほぼ均等に濁るが若干の菌体の沈降もみられる	同左	同左	中等度の生育、菌体は集合する傾向を有し菌体の沈降もみられる
(4)肉汁ゼラチン穿刺培養	中等度の生育、ゼラチンを液化しない	同左	同左	同左
(5)リトマスミルク	微弱にアルカリ性化する、液化凝固はみられない	同左	同左	同左
生理的性質				
(1)硝酸塩の還元	還元する	同左	同左	同左
(2)脱窒反応	陰性	同左	同左	同左
(3)MRテスト	陰性ないし微陽性	陰性	陰性ないし微陽性	陽性
(4)VPテスト	陽性	陰性	陽性	陰性
(5)インドールの生成	陰性	同左	同左	同左
(6)硫化水素の生成	陽性	同左	同左	同左
(7)デンプンの加水分解	陰性	同左	同左	同左
(8)クエン酸の利用	Koserの培地で生育しないChristensenの培地で生育し培地をアルカリ性にする	同左	同左	同左
(9)無機窒素の利用	硝酸塩を利用しないアンモニウム塩を利用する	同左	同左	同左
(10)色素の生成	菌体外に色素を生成しない	同左	同左	
(11)ウレアーゼテスト	陰性ないし微陽性	陰性	陰性ないし微陽性	陽性
(12)オキシダーゼ	陰性	同左	同左	同左
(13)カタラーゼ	陽性	同左	同左	同左
(14)生育の範囲	pH7~9.5で良好な生育をする25-45°で良好な生育をする46°で微かな生育が認められる	同左	同左	pH7~9.5で良好な生育をする25-44°で良好な生育をする、45°で微かな生育が認められる
(15)酸素に対する態度	好気性ないし通性嫌気性	同左	同左	同左
(16)Fテスト(ブドー糖)	発酵的に生育し酸を生成する	同左	同左	同左
(17)糖からの酸生成				
①L-アラビノース	陰性	同左	同左	同左
②D-キシロール	陰性	同左	同左	同左
③D-グルコース	陽性	同左	同左	同左
④D-マンノース	陽性	同左	同左	同左
⑤D-フラクトース	陽性	同左	同左	同左
⑥D-ガラクトース	陰性	同左	同左	同左
⑦麦芽糖	陽性	同左	同左	陰性
⑧ショ糖	陽性	同左	陰性	陽性
⑨乳糖	陰性	同左	同左	同左
⑩トレハロース	陰性	同左	陽性	陰性
⑪D-ソルビット	陰性	同左	同左	同左
⑫D-マンニット	陰性	同左	同左	陽性
⑬イノシット	陰性	同左	同左	陽性
⑭グリセリン	陰性	同左	同左	同左
⑮デンプン	陰性	同左	同左	同左

	AJ12308	AJ12309	AJ12310	AJ12340
基の他の特徴的性質				
(1)温度抵抗性	スキムミルク中キャピラリー法で60°-10分で生残する 65°-10分で死滅する	スキムミルク中キャピラリー法で55°-10分で生残する。 60°-10分で死滅する	スキムミルク中キャピラリー法で60°-10分で生残する 65°-10分で死滅する	スキムミルク中キャピラリー法で55°-10分で生残する 60°-10分で死滅する
(2)塩化ナトリウム耐性	5%食塩含有培地で生育する	同左	同左	同左
(3)栄養要求性	生育にビオチンを要求する	同左	同左	同左
(4)DNAの塩基組成(Tm法)	60.2%GC	59.5%GC	59.0%GC	56.8%GC
(5)細胞壁に含まれる2塩基性アミノ酸	メソジアミノピメリン酸	同左	同左	同左
(6)分離源	果実	野菜	土壌	果実

ここに示したようにこれらの菌株（以下本発明菌という）はいずれも好氣的に生育するグラム陽性の無孢子桿菌であるところからコリネフォルム細菌群に属する。さらに、細胞分裂の様式がスナッピングタイプである、細胞壁に含まれる2塩基アミノ酸がメソジアミノピメリン酸である、5%食塩含有培地で生育出来る耐滲透圧性菌である、生育にビオチンを必要とする、後述する実施例で示すように糖から高収率で著量のグルタミン酸を生成し培地中に蓄積する、などの特徴的性質を有するが、これらの性質は従来知られているグルタミン酸生産菌と同一である。また其の他の形態的性質、生理生化学的性質においても多くの性状が既知のグルタミン酸生産菌と共通である。以上のことから、本発明菌は既知のグルタミン酸生産菌と属のレベルでは同一の属に属せしめるのが妥当であろうと考えられる。既知のグルタミン酸生産菌をどの属に分類するかは前述の通り見解のわかれるところであるが、文献①～⑩などを参考にした上で編さんされたコリネフォルム細菌群にかかわる最新のパージースマニュアル第8版では既知のグルタミン酸生産菌はコリネバクテリウム属とプレバクテリウム属とにわけられて記載されている。しかし本マニュアルではプレバクテリウム属そのものを分類学的に不確定な属（Genus incertae sedis）として扱い、コリネバクテリウム属は正規な属として扱っていることを考慮すれば本発明菌をコリネバクテリウム属に属せしめるのが現時点ではもっとも妥当であると考えられる。次に本発明菌の種レベルでの分類学的考察を行う。本発明菌と既知のグルタミン酸生産菌との菌学的性質面で共通して異なるものは以下の3性質である。第1は明瞭な生育を示す最高温度が43°以上であるという点である。前述したように既知のグルタミン酸生産菌の最高生育温度は文献的にも、また発明者らは実施した試験結果からも42°程度ないし42°以下であり43°以上で生育するものは存在しない。第二は温度抵抗性である。温度抵抗性は試験管など大容量で試験する場合には熱の伝導時間などのばらつきから正しい結

果が得られにくく、スキムミルク中に菌を懸濁しこれをガラスキャピラリーに封入してテストする方法が最良とされている（文献③）本発明菌はすべての菌株がスキムミルク中、キャピラリーチューブ検定法で55°-10分の処理で生残する。これに対し既知グルタミン酸菌は本法で行えば55°-10分処理で大部分の菌株は死滅するが、微かな生残をする菌株もあるとの報告（文献③）がある。

発明者らはこの点についても追試を行なった。表-1に示した既知のグルタミン酸生産菌のすべてについて本発明菌と同じ条件下で温度抵抗性試験を行った結果、既知のグルタミン酸生産菌はすべて55°-10分の処理で死滅した。これに対し本発明菌は55°-10分の処理で分離株14株のすべてが生残し、さらにこのうち11株は60°-10分の処理でも生残した。

第三の特徴的性質は、本発明菌は43°においても著量のグルタミン酸を蓄積することである。本試験の条件及びグルタミン酸の蓄積量は実施例に示した通りである。同条件で表-1に示した既知グルタミン酸生産菌株のグルタミン酸の蓄積性を検定したがすべての菌株が生育せず、蓄積したグルタミン酸も実質的に無であった。以上述べた本発明菌の性質は既知のグルタミン酸生産菌にみられない性質で、特に最高生育温度や温度抵抗性の性質は微生物変異操作によって上昇させることは不可能な安定した性質と考えられているので本発明菌は既知のグルタミン酸生産菌の何れとも別種であるとするに充分な根拠を有するものと解釈できる。また、本発明菌分離株14株の菌株相互間では生育状態やコロニーの色調などの形態的性質の僅かな差異、例えばショ糖、麦芽糖、トレハロース、マンニット、イノシットなどからの酸生成、MR、VP、硝酸塩還元及びウレアーゼ、などで生理生化学的性質の差異がみられたが、これらの差異は菌株レベルの差異であり、種をわける程の差異とすることは不適当と考え、本発明菌はすべて同一種に属するものと認定した。なお、本発明菌をグルタミン酸生産菌以外のコリネフォ

ルム細菌群に属する菌種と対比して検索を行ったが、該当する菌種は存在しなかった。以上の考察より本発明菌は何れの菌株もコリネバクテリウム属に属する新菌種と認め、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス (*Corynebacterium thermoaminogenes* nov. sp) と命名した。本菌種に属する代表的菌株はAJ12308, AJ12309, AJ12310, AJ12340であり、これらの菌株はそれぞれFERMBP-1540, 1541, 1542, 1539として寄託されている。

#### 実施例-1

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12308を用い、<表-2>に示した培地組成を有する培養液を容量1ℓの小型発酵槽に300ml張り込み、培養液のpHが7.5~8.0に保たれるようにアンモニアガスを適宜加えつつ43℃で培養した。培養開始5時間後、比濁が0.6に達したときにペニシリンを3U/mlの濃度になるように添加しさらに培養を継続した。培養16時間後の培養液を高速液体クロマトグラフで分析した結果、39.1g/ℓの濃度でグルタミン酸が蓄積していた。なおこのとき併行して同条件でプレバクテリウム・フラブムATCC 13826を用いて行った場合のグルタミン酸の蓄積量は0.1g/ℓ以下であった。

〈表-2〉 グルタミン酸発酵試験  
に使用した培地の組成

グルコース	100g
大豆分解液(全窒素として)	0.36g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	1g
Fe <sup>++</sup> , Mn <sup>++</sup>	各2mg
ビタミン・B <sub>1</sub> ・HCl	100γ
ビオチン	100γ
硫酸アンモニウム	5g
水	1,000ml

pH7.8

#### \* 実施例2

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12309を用い実施例1と同様な方法でグルタミン酸発酵を行った結果、培養19時間後の培養液中に40.0g/ℓの濃度でグルタミン酸が蓄積した。

#### 実施例3

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12310を用い実施例1と同様な方法でグルタミン酸発酵を行った結果、培養17時間後の培養液中に35.2g/ℓの濃度でグルタミン酸が蓄積した。

#### 実施例4

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12340を用い実施例-1と同様な方法でグルタミン酸発酵を行った結果、培養18時間後の培養液中に38.1g/ℓの濃度でグルタミン酸が蓄積した。

#### 実施例-5

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12308を用い、<表-2>に示した培地組成よりグルコースと硫酸アンモニウムを除き酢酸アンモニウムを20gを添加した培地組成を有する培養液を容量1ℓの小型発酵槽に300ml張り込み、培養液のpHが7.5~8.0に保たれるように酢酸或はアンモニアガスを適宜加えつつ40℃で培養した。培養開始8時間後、比濁が0.6に達したときにペニシリンを3U/mlの濃度になるように添加しさらに培養を継続した。培養24時間後の培養液を高速液体クロマトグラフで分析した結果32g/ℓの濃度で蓄積していたが、これは対酢酸収率31.5%であった。

10  
20  
\*